

В. М. Пушкаръов, О. І. Ковзун, В. В. Пушкаръов,
член-кореспондент НАН України **М. Д. Тронько**

Дія паклітакселу та інгібітора ядерного фактора NF- κ B на пухлини раку щитоподібної залози *in vivo*

Інгібітор ядерного фактора капа В (NF- κ B) дегідроксиметилепоксиквіноміцин (DHMEQ) посилює лікувальний ефект паклітакселу щодо пухлин, які утворюються шляхом ксенотрансплантації клітин анапластичної карциноми щитоподібної залози лінії FRO. У тварин, пролікованих паклітакселом та інгібітором NF- κ B, спостерігали зменшення об'єму пухлин, що вірогідно відрізнялося від ефектів кожної зі сполук окремо. Таким чином, комбіноване застосування паклітакселу та інгібітора NF- κ B є перспективною стратегією для подальших доклінічних досліджень, що мають за мету розробку нових хіміотерапевтичних підходів для лікування анапластичного раку щитоподібної залози.

Таксани є ефективними протипухлинними препаратами, що використовуються для лікування деяких видів раку [1]. Проводяться дослідження щодо їх застосування для терапії пухлин щитоподібної залози (ЩЗ) [2], які показали, що паклітаксел або доцетаксел у комбінації з гемцитабіном є найбільш ефективним сполученням [3]. Одержані *in vitro* дані свідчать про те, що паклітаксел активує в пухлинних клітинах не тільки процеси, які спричиняють клітинну смерть, але й механізми, що протидіють загибелі клітин [2]. Тому актуальними є дослідження, які б дали змогу визначити способи інактивації сигнальних каскадів, що беруть участь у формуванні стійкості ракових клітин до цього протипухлинного препарату.

Ядерний транскрипційний фактор NF- κ B задіяний у багатьох сигнальних механізмах, що обумовлюють процеси проліферації, диференціації, поділу, виживання та міграції клітин [4]. Порушення його функції призводить до запальних процесів та виникнення ряду захворювань, у тому числі і канцерогенезу [5]. Більше того, саме NF- κ B вважають головним посередником, який пов'язує запальні процеси і злякисну трансформацію тканин [6, 7]. Є також дані, що NF- κ B проявляє антиапоптозні ефекти та ініціює канцерогенез в карциномах щитоподібної залози [8, 9].

Показано, що паклітаксел посилює активацію та експресію кіназного комплексу ІКК (I κ B-кіназа) [10], який призводить до вивільнення фактора NF- κ B з неактивного комплексу і транспортування його до ядра. Оскільки фактор NF- κ B відіграє важливу роль в антиапоптозних процесах, обумовлює хемо- та радіорезистентність пухлинних клітин [11], очікувалося, що його пригнічення буде посилювати лікувальний ефект паклітакселу в пухлинах.

Мета дослідження полягала у вивченні комбінованої дії паклітакселу та специфічного інгібітора ядерного чинника NF- κ B — DHMEQ — щодо росту пухлин, одержаних шляхом ксенотрансплантації трансгенним мишам клітин раку щитоподібної залози лінії FRO.

Препарат DHMEQ був люб'язно наданий доктором К. Умезава (Університет Кейо, Йокогама, Японія). Стоковий розчин рацемату DHMEQ (10 мг/мл) готували на диметилсульфоксиді (ДМСО) і зберігали при -20 °С.

Клітинна лінія FRO була одержана від проф. В. О. Саєнко (Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Нагасакі, Японія), а введена в культуру J. A. Fagin (University

of Cincinnati College of Medicine, Цинциннаті, Огайо, США). Лінія характеризується: мутацією в гені BRAF(600E), відсутністю експресії тироїдного транскрипційного фактора-1 та PAX-8.

Клітини культивували в середовищі RPMI-1640, що містило 5% бичачої сироватки (FBS), пеніцилін/стрептоміцин (100 Од./мл/100 мкг/мл відповідно), в атмосфері з 5% CO₂ при 37 °С протягом 2 діб, промивали два рази PBS-буфером (80 ммоль/л ортофосфат натрію однозаміщений, 20 ммоль/л ортофосфат натрію двоаміщений, 100 ммоль/л хлорид натрію, рН 7,4) і замінювали середовище. Через 24 год вносили розчинений у ДМСО паклітаксел фірми "Wako Chemicals" (Японія) та препарат DHMEQ і інкубували клітини протягом наступних 24 год. У контрольні проби вносили в такій же кількості ДМСО. Визначення життєздатності клітин проводили в 96-лункових планшетах у середовищі RPMI-1640, що містило 5% FBS. Суспензію клітин (приблизно 1000 клітин) вносили в лунки і інкубували протягом 24 год. Паклітаксел та DHMEQ, розчинені в ДМСО, додавали в зростаючих концентраціях, по 6 лунок на кожну концентрацію. Після інкубації визначали кількість живих клітин за допомогою WST-тесту.

Досліди *in vivo* проводили на ксенотрансплантатах. Для цього мишам BALB/c *nu/nu*, яких було розділено на чотири групи, у кожній по дев'ять трансгенних, безтимусних, 8-тижневих за віком самок, підшкірно вводили в стегно задньої лапки суспензію клітин FRO, суспендованих у RPMI-1640 ($5 \cdot 10^6$ клітин на тварину). Маса тварин становила близько 25 мг. Розмір пухлини замірювали через 1 добу і розраховували за формулою $a^2 \times b \times 0,4$, де a — найменший діаметр пухлини, b — діаметр пухлини, перпендикулярний до a . Лікування паклітакселем та DHMEQ починали після того, як розмір пухлин наближався до 100 мм³. Препарати паклітакселу (10 мг/кг на добу) і DHMEQ (8 мг/кг на добу) вводили внутрішньочеревно в суміші, що складалася з Cremophor EL ("Sigma", США), етанолу та PBS (1 : 1 : 1). Тваринам контрольної групи вводили в такій же кількості цю суміш без препаратів.

Статистичну обробку даних проводили за Стьюдентом. Значення $P < 0,05$ вважали за вірогідні.

Вплив ядерного фактора NF- κ B на апоптозні процеси в пухлинних клітинах інтенсивно досліджується. Було показано, що фактор активує групу генів, продукти яких гальмують апоптоз шляхом пригнічення каспаз [12]. Тому припускалося, що пригнічення NF- κ B інгібітором DHMEQ призведе до посилення цитотоксичного ефекту паклітакселу щодо клітин анапластичного раку щитоподібної залози та трансплантованих пухлин.

Поєднання паклітакселу з DHMEQ призводить до загибелі частини клітин FRO вже через 24 год інкубації (рис. 1). Більш ефективною виявилася комбінація зі зростаючих концентрацій DHMEQ з 5 нмоль/л паклітакселу.

З рис. 2 видно, що підсажені мишам клітини утворюють пухлину, яка досить швидко росте, досягаючи через 7 діб у контрольній групі 350% початкового об'єму пухлини. Лікування тварин інгібітором NF- κ B, DHMEQ, призводить до вірогідного гальмування росту пухлини. Паклітаксел виявився ефективнішим *in vivo*. Розмір пухлини зменшувався більш ніж у два рази порівняно з початковим об'ємом, до лікування. Ще ефективнішою була комбінована дія паклітакселу з DHMEQ, в результаті якої об'єм пухлини зменшувався більш ніж у чотири рази. Ефект поєданого лікування обома препаратами вірогідно відрізнявся від дії кожної зі сполук окремо (див. рис. 2).

Отже, комбінована дія паклітакселу та інгібітора NF- κ B більшою мірою посилює апоптозні процеси в пухлинах анапластичного раку ЩЗ, ніж кожен з агентів окремо і, таким

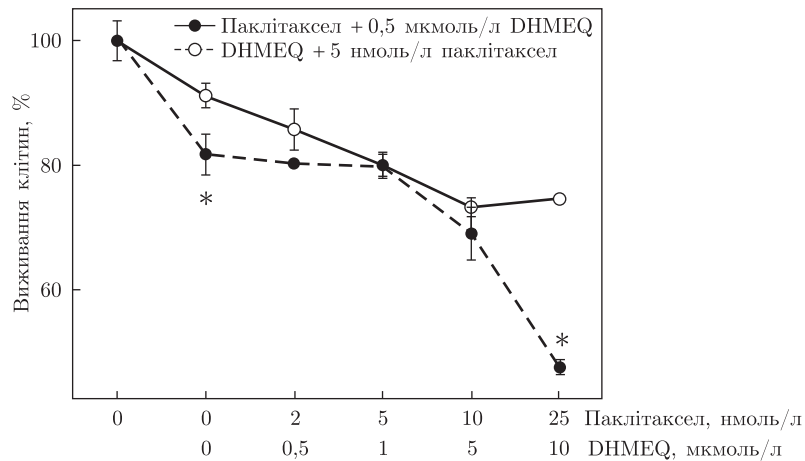


Рис. 1. Ефект комбінованої дії інгібітора NF-κB — DHMEQ та протипухлинного препарату паклітакселу на виживаність клітин анапластичного раку щитоподібної залози.

* — відміни від відповідної точки іншої кривої вірогідні, $P < 0,05$; $n = 6$, $M \pm m$

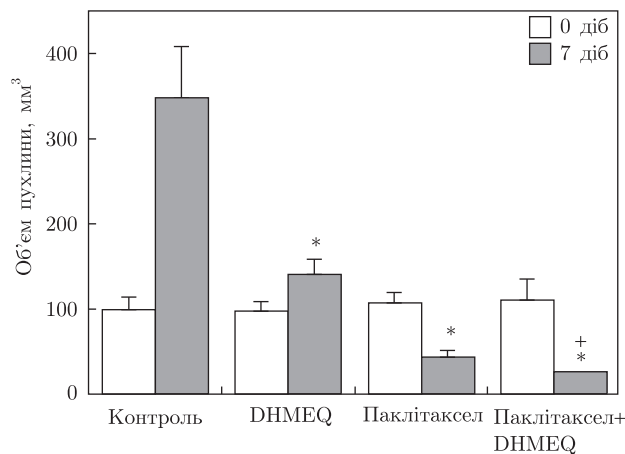


Рис. 2. Ефект комбінованої дії інгібітора NF-κB — DHMEQ та протипухлинного препарату паклітакселу на розмір ксенотрансплантованої трансгенним мишам пухлини анапластичного раку щитоподібної залози.

* — відміни від контролю (7 доба) вірогідні, $P < 0,05$; + — різниця між ефектом DHMEQ і паклітакселу окремо та їх комбінації вірогідна, $P < 0,05$. В досліді використовували 4 групи по 9 тварин, $M \pm m$

чином, комбінація цих препаратів може бути перспективним варіантом для доклінічних досліджень щодо терапії агресивних, метастатуючих та радіойдрезистентних форм раку ЩЗ.

1. Jordan M. A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs // *Nat. Rev. Canc.* – 2004. – 4. – P. 253–265.
2. Pushkarev V. M., Starenki D. V., Saenko V. A. et al. Molecular mechanism of the effects of low concentrations of taxol in anaplastic thyroid cancer cells // *Endocrinology*. – 2004. – 145, No 7. – P. 3143–3152.
3. Тронько М. Д., Пушкарьов В. В., Ковзун О. І., Пушкарьов В. М. Анапластична карцинома щитоподібної залози: нові підходи до її лікування // *Ендокринологія*. – 2013. – 18, № 2. – С. 78–91.
4. Orłowski R. Z., Baldwin A. S., jr. NF-κB as a therapeutic target in cancer // *Trends Mol. Med.* – 2002. – 8, No 8. – P. 385–389.
5. Liptay S., Weber C. K., Ludwig L. et al. Mitogenic and antiapoptotic role of constitutive NF-κB/Rel activity in pancreatic cancer // *Int. J. Cancer*. – 2003. – 105. – P. 735–746.
6. Karin M. The IκB kinase – a bridge between inflammation and cancer // *Cell Res.* – 2008. – 18. – P. 334–342.

7. Wang H., Cho C.H. Effect of NF- κ B signaling on apoptosis in chronic inflammation-associated carcinogenesis // Curr. Cancer Drug Targets. – 2010. – **10**, No 6. – P. 593–599.
8. Pacifico F., Mauro C., Barone C. et al. Oncogenic and anti-apoptotic activity of NF- κ B in human thyroid carcinomas // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, No 52. – P. 54610–54619.
9. Pacifico F., Leonardi A. Role of NF- κ B in thyroid cancer // Mol. Cell. Endocrinol. – 2010. – **321**, No 1. – P. 29–35.
10. Ковзун О. І., Пушкарьов В. В. Таксол посилює фосфорилування ізоформ протеїнкінази С та кіназного комплексу ІКК у клітинах анапластичного раку щитовидної залози // Ендокринологія. – 2005. – **10**, № 1. – С. 130–133.
11. Chen W., Li Z., Bai L., Lin Y. NF- κ B in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target // Front. Biosci. – 2011. – **16**. – P. 1172–1185.
12. Luo J. L., Kamata H., Karin M. IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death – a new approach to cancer therapy // J. Clin. Invest. – 2005. – **115**, No 10. – P. 2625–2632.

ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин
і.м. В. П. Комісаренка НАМН України”, Київ

Надійшло до редакції 23.12.2013

В. М. Пушкарев, Е. І. Ковзун, В. В. Пушкарев,
член-корреспондент НАН України **Н. Д. Тронько**

Действие паклитаксела и ингибитора ядерного фактора NF- κ B на опухоли рака щитовидной железы *in vivo*

Ингибитор ядерного фактора каппа В (NF- κ B) дегидроксиметилэпоксиквиномицин (DHMEQ) усиливает лечебный эффект паклитаксела относительно опухолей, которые образуются путем ксенотрансплантации клеток анапластической карциномы щитовидной железы линии FRO. У животных, пролеченных паклитакселом и ингибитором NF- κ B, наблюдали уменьшение объема опухолей, что достоверно отличалось от эффектов каждого из соединений в отдельности. Таким образом, комбинированное применение паклитаксела и ингибитора NF- κ B является перспективной стратегией для дальнейших доклинических исследований, имеющих целью разработку новых химиотерапевтических подходов для лечения анапластического рака щитовидной железы.

V. M. Pushkarev, O. I. Kovzun, V. V. Pushkarev,
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. D. Tronko**

Effects of paclitaxel and nuclear factor NF- κ B inhibitor in thyroid cancer tumors *in vivo*

Nuclear factor kappa B (NF- κ B) inhibitor dehydroxymethyl epoxyquinomicin (DHMEQ) enhances the therapeutic effect of paclitaxel on tumors formed by the xenotransplantation of anaplastic thyroid carcinoma FRO cells. In animals treated with paclitaxel and NF- κ B inhibitor, a reduction in the tumor volume was observed, which is significantly different from the effects of each of the compounds in particular. Thus, the combined use of paclitaxel and NF- κ B inhibitor is a promising strategy for further preclinical studies for developing the new chemotherapeutic approaches for the anaplastic thyroid cancer treatment.